



Resistência a antibióticos em bactérias isoladas de animais selvagens de regiões remotas

Marlene Sofia Oliveira Mendes

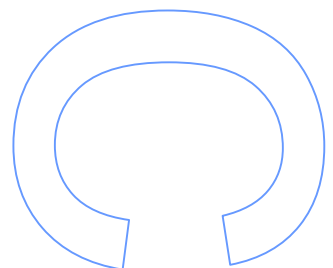
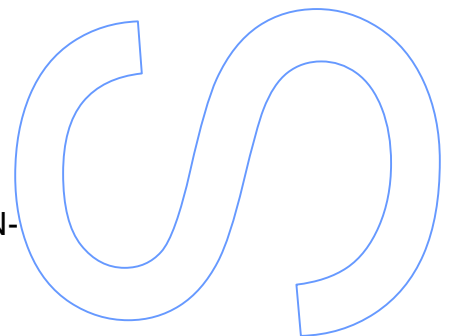
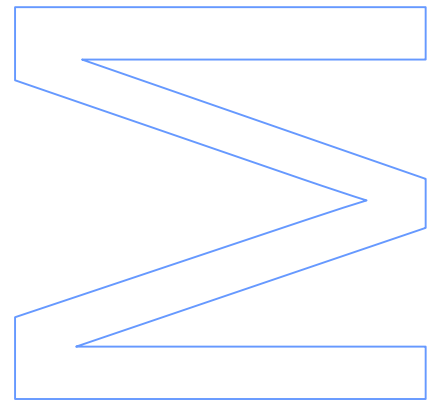
Biologia e Gestão da Qualidade da Água
Departamento de Biologia
2012

Orientador

Professora Doutora Sandra Quinteira, Professor Coordenador do IPSN-CESPU

Coorientador

Professor Doutor Nuno Monteiro, Investigador auxiliar, CIBIO, FCUP
e Professor auxiliar, UFP



Este trabalho foi apoiado financeiramente pela Universidade do Porto / Santander Totta “Projetos Pluridisciplinares 2010” (PP-199/2010) e pela Cooperativa de Ensino Superior, Politécnico e Universitário - CESPU (05-2011/CITS).

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais e à minha irmã, todo o apoio, amor e compreensão que me têm dado ao longo de toda a minha vida.

À minha orientadora, Prof. Doutora Sandra Quinteira, quero agradecer a orientação, empenho, dedicação e disponibilidade que sempre demonstrou ao longo da realização desta tese e também pela oportunidade que me deu de trabalhar numa área desconhecida para mim.

Ao Prof. Doutor Nuno Monteiro, pela disponibilidade e por toda a ajuda que me deu ao longo da realização da tese.

A todas as pessoas no CIBIO que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

Às minhas amigas e companheiras que sempre me deram apoio e incentivo para continuar mesmo nas horas em que duvidei de mim mesma e achei que já não tinha forças para continuar.

À CESPU, à Universidade do Porto e ao Santander Totta pelo financiamento do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese, um muito obrigado.

Resumo

O fenómeno de resistência aos antibióticos é reconhecido globalmente como um sério risco para a saúde pública que continuamente preocupa e desafia a comunidade científica. Embora os mecanismos subjacentes a este fenómeno sejam bem conhecidos em ambiente hospitalar, não existe ainda informação suficiente sobre o papel exercido, na disseminação e aquisição de determinantes de resistência, por outros nichos ecológicos, nomeadamente das comunidades bacterianas que habitam a fauna selvagem, parte da qual em risco de extinção. Assim, constituiu um dos principais objetivos deste trabalho a caracterização fenotípica e genotípica do microbioma associado a várias espécies animais icónicas que habitam um dos últimos entrepostos selvagens do mundo, a região da Rota da Seda e a região do Planalto Tibetano (Teto do mundo), com a pesquisa de determinantes genéticos de resistência a antibióticos associados aos fenótipos de suscetibilidade observados.

Foi possível utilizar, para além de amostras de fezes de várias espécies animais em risco de extinção, ou ameaçadas, amostras de fezes de *Equus kiang*, o burro selvagem tibetano. As amostras de fezes foram recolhidas no decurso de uma expedição à região de Xinjiang, na China e de uma colaboração com investigadores no Tibete que recolheram as amostras relativas ao *kiang*. As bactérias, associadas aos diferentes animais, foram obtidas após um processo de seleção em meios de cultura, suplementados e não suplementados com diferentes classes de antibióticos e foram identificadas por provas bioquímicas clássicas, sistemas automáticos de identificação e, em algumas situações, por PCR. A determinação da suscetibilidade aos diferentes agentes antimicrobianos, de cada isolado obtido, foi efetuada pelo método de difusão com discos, de acordo com as normas e critérios definidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). A pesquisa de genes codificadores de resistência (por exemplo, *tetM*, *tetL*, *tetO*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*) e a deteção da presença de integrões de classe 1 foi realizada por PCR.

Em geral, foi possível isolar bactérias que apresentaram fenótipos de resistência a partir das amostras de todos os animais da região de Xinjiang. Foram detetados elevados níveis de resistência à tetraciclina e à vancomicina em *Enterococcus* e também elevadas resistências ao imipenemo e à cefotaxima em bactérias de Gram negativo. Em relação à pesquisa de genes codificadores de resistência foi possível detetar a presença de *tetM*, *ermB* e também de *bla_{CTX-M}*. A presença de integrões de classe 1 também foi detetada.

Com estes resultados foi possível verificar que a resistência se estende além do ambiente hospitalar encontrando-se também presente em ambientes remotos pouco povoados.

Palavras-chave: antibióticos, animais selvagens, resistências, locais remotos

Summary

Antibiotic resistance is globally recognized as a serious risk to public health concerning and continually challenging the scientific community. Although the mechanisms underlying this phenomenon are well known in the hospital setting, there is not enough information about the role played in the dissemination and acquisition of resistance determinants for other ecological niches, including bacterial communities inhabiting wildlife, some of which endangered. So one of the main objectives of this study was the phenotypic and genotypic characterization of the microbiome associated with several iconic animal species that inhabit one of the world's last wild depot, the region of the Silk Road and the Tibetan Plateau (Roof of the World), with the research of genetic determinants of antibiotic resistance associated with the phenotypes of susceptibility observed.

It was possible to use, in addition to fecal samples of various animal species at risk of extinction or endangered, fecal samples of *Equus kiang*, the Tibetan wild ass. Stool samples were collected during an expedition to the Xinjiang region in China and in collaboration with researchers of Tibet who collected the samples related to *kiang*. Bacteria associated with the different animals were obtained after a process of selection in culture media supplemented and non-supplemented with various classes of antibiotics, and were identified by classical biochemical tests, automatic identification, and in some instances, by PCR. The determination of susceptibility to several antimicrobial agents obtained from each isolate was performed by disk-diffusion method, according to the standards and criteria established by the *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). The search for genes encoding resistance (for example, *tetM*, *tetL*, *tetO*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*) and detection of the presence of class 1 integrons was performed by PCR.

In general, it was possible to isolate bacteria that showed phenotypes of resistance from the samples of all animals of the Xinjiang region. High levels of resistance to vancomycin and tetracycline in *Enterococcus* were detected and also high resistance to cefotaxime and imipenem in Gram negative bacteria. Regarding the study of genes encoding resistance it was possible to detect the presence of *tetM*, *ermB* and also *bla_{CTX-M}*. The presence of class 1 integrons was also detected.

With these results it was possible to verify that resistance extends beyond the hospital environment and it is also present in remote environments sparsely populated.

Key Words: antibiotics, wild animals, resistance, remote locations.

Índice

Lista de Figuras	9
Lista da Tabelas	10
1. Introdução.....	13
1.1 Antibióticos e resistência	13
1.2 Principais grupos de antibióticos.....	16
2. Objetivos.....	20
3. Material e Métodos	21
3.1 Caracterização do local de amostragem e origem das amostras	21
3.2 Obtenção dos isolados	23
3.3 Identificação dos isolados obtidos	24
3.4 Avaliação da suscetibilidade a agentes antimicrobianos.....	25
3.5 Caracterização de genes de resistência a antibióticos.....	26
3.5.1 Condições gerais das reações de amplificação de DNA por PCR	26
3.5.1.1 Preparação do DNA bacteriano	26
3.5.1.2 Condições de amplificação	26
3.5.1.3 Eletroforese em gel de agarose	27
4. Resultados e Discussão	30
4.1 Isolados obtidos.....	30
4.2 Identificação dos Isolados obtidos	31
4.3 Avaliação da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados obtidos	32
4.3.1 Avaliação da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos em isolados provenientes das amostras da região de Xinjiang.....	32
4.3.2 Avaliação da suscetibilidade em isolados provenientes das amostras de <i>Equus kiang</i>	34
4.4 Caracterização dos genes de resistência	37
4.4.1 Caracterização da resistência à tetraciclina	37

4.4.1.1	Isolados obtidos das amostras de Xinjiang	37
4.4.1.2	Isolados obtidos das amostras do Planalto Tibetano.....	38
4.4.2	Caracterização da resistência aos macrólidos	39
4.4.2.1	Isolados obtidos das amostras de Xinjiang	39
4.4.2.2	Isolados obtidos das amostras do Planalto Tibetano.....	40
4.4.3	Pesquisa de <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{SHV}	41
4.4.3.1	Isolados obtidos das amostras de Xinjiang	41
4.4.3.2	Isolados obtidos das amostras do Planalto Tibetano.....	41
4.5	Pesquisa da presença de Integrões.....	41
4.5.1	Isolados obtidos das amostras de Xinjiang	42
4.5.2	Isolados obtidos das amostras do Planalto Tibetano	43
5.	Conclusão Geral	44
6.	Referências bibliográficas	46

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura do integrão.....	15
Figura 2 – Região de Xinjiang e Planalto Tibetano.....	21
Figura 3 – Alguns exemplares dos animais selvagens amostrados.....	22
Figura 4 – Diferentes áreas percorridas, durante mais de 5000 Km, no decurso da expedição "Silk Road 2010 Expedition".....	23
Figura 5 – Gel resultante do PCR de pesquisa de genes de resistência à tetraciclina.....	38
Figura 6 – Gel resultante do PCR de pesquisa de genes de resistência aos macrólidos.....	40

Lista da Tabelas

Tabela 1 - Espécies animais amostradas e respetiva classificação do estado de conservação.....	22
Tabela 2 - Agentes antimicrobianos utilizados na suplementação das placas e as suas respetivas concentrações.....	24
Tabela 3 - Descrição da sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para <i>Enterococcus</i> spp.....	27
Tabela 4 - Descrição dos <i>primers</i> , reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para as diferentes reações de PCR para <i>Enterococcus</i> spp.....	28
Tabela 5 - Descrição da sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para bactérias de Gram negativo.....	28
Tabela 6 - Descrição dos <i>primers</i> , reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para as diferentes reações de PCR para bactérias de Gram negativo.....	29
Tabela 7 – Isolados obtidos a partir das amostras de animais provenientes da região de Xinjiang.....	31
Tabela 8 – Isolados obtidos das amostras de <i>kiang</i> provenientes do Planalto Tibetano.....	31
Tabela 9 – Identificação dos isolados provenientes da região de Xinjinag e do Planalto Tibetano.....	32
Tabela 10 – Comparação entre as percentagens de resistência aos antibióticos dos isolados provenientes dos animais da região de Xinjiang e do Planalto Tibetano.....	36
Tabela 11 – Resultados da pesquisa dos genes de resistência à tetraciclina para as amostras da região de Xinjiang.....	37
Tabela 12 – Resultados da pesquisa de genes de resistência à tetraciclina para as amostras do Planalto Tibetano.....	38
Tabela 13 – Resultados da pesquisa de genes de resistência aos macrólidos para as amostras da região de Xinjiang.....	39

Tabela 14 – Resultados da pesquisa de genes de resistência aos macrólidos para as amostras do Planalto Tibetano.....40

Tabela 15 – Integrões encontrados, o seu tamanho e proveniência do isolado.....42

Lista de Abreviaturas

AMC – Amoxicilina/Ácido Clavulânico

AML – Amoxicilina

ATM – Aztreonamo

BHI – *Brain Heart Infusion*

CAZ – Ceftazidima

CIBIO – Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos

CIP – Ciprofloxacina

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CTX – Cefotaxima

ESBL – *Extended Spectrum β -Lactamases* (β -lactamases de Espectro Alargado)

GEN – Gentamicina

IPM – Imipenemo

ORF – *Open Reading Frames*

PBP – *Penicillin Binding Proteins*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

TBE – *Tris-borate, EDTA buffer*

TE – Tetraciclina

TOB – Tobramicina

TSB – *Tryptic Soy Broth*

1. Introdução

1.1 Antibióticos e resistência

A introdução de agentes antimicrobianos na terapêutica, nos anos 40, foi sem dúvida um marco na história da medicina. Poucos desenvolvimentos tiveram um impacto tão grande na melhoria da qualidade de vida, como a possibilidade de combater as doenças infecciosas, muitas delas fatais, que desta forma puderam começar a ser facilmente tratadas. ^[1]

No entanto, as bactérias têm uma capacidade única de se adaptar e desenvolver mecanismos para se protegerem contra compostos tóxicos. ^[2] Logo após a introdução dos antibióticos na terapêutica humana, foi descoberta, em 1940, numa estirpe de *Escherichia coli*, uma enzima capaz de destruir a penicilina. ^[3] Atualmente, a resistência aos antibióticos encontra-se disseminada a bactérias pertencentes a diferentes géneros ^[1] e um dos nichos ecológicos mais importantes no aparecimento de elevados níveis de resistência é, sem dúvida, o hospital. ^[4] ^[5] Nestes locais a aglomeração física de pacientes num espaço limitado e o uso frequente de antibióticos durante o processo terapêutico, faz com que surjam bactérias com elevados níveis de resistência resultantes de mecanismos de adaptação a esse ambiente seletivo e hostil. ^[6]

Ainda que com menor incidência, bactérias resistentes têm sido também isoladas a partir de ambientes aparentemente não sujeitos a uma pressão seletiva por agentes antimicrobianos, como plantas e água de consumo, fenómeno associado à crescente utilização destes compostos em explorações animais em conjunto com descargas de esgotos sem tratamento prévio. ^[5] Assim, o surgimento e evolução da resistência a antibióticos entre bactérias patogénicas representam, hoje, um grave problema de saúde pública à escala global. ^[5] ^[7]

Zonas urbanas, densamente povoadas, são historicamente vista como *hotspots* para bactérias resistentes, ^[4] ^[8] mas recentemente, tem sido dedicada atenção à caracterização de ambientes não clínicos, tais como áreas remotas do globo, longe de pressão antropogénica direta, como uma fonte e/ou reservatório de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos. ^[2] ^[7] ^[9]

Foram já encontradas bactérias com surpreendentes níveis de resistência em ambientes remotos, aparentemente livres de exposição aos antibióticos, como é o caso da Amazónia e da Bolívia. ^[10] ^[11]

Alguns estudos recentes defendem que os genes de resistência pré-datam a utilização dos antibióticos na terapêutica e que a resistência é um fenómeno antigo, natural e disperso no ambiente ^{[12] [13]} Estes estudos, contudo, têm produzido alguns resultados contraditórios e estimulado a discussão em torno do real significado de “selvagem” e da verdadeira relação entre a utilização dos antibióticos e a emergência da resistência a estas moléculas ^{[6] [9]} Embora alguns autores justifiquem a presença de resistência a antibióticos em áreas remotas como sendo um subproduto das migrações das aves, ^{[2] [14] [15]} o grau e sentido de disseminação, bem como o papel de animais selvagens neste complexo processo não está claramente estabelecido ^{[2] [16]} Assim, o estudo da fauna selvagem endémica que habita estas regiões remotas e muitas vezes exóticas, com a caracterização da flora microbiana associada, torna-se uma das abordagens mais lógicas e importantes para a deteção e/ou identificação de novos mecanismos de resistência.

A resistência que as bactérias apresentam aos antibióticos pode ser natural (ou intrínseca) e, neste caso, depende das características genéticas da espécie bacteriana, ou ser adquirida. Esta pode ser o resultado de mutações cromossómicas (transferência vertical dos genes de resistência) ou de transferência genética, com aquisição de fragmentos de DNA extracromossómico (plasmídeos e transposões).

A análise de plasmídeos e transposões levou à descoberta dos integrões. Estes são elementos genéticos naturais, envolvidos na captura, mobilização e expressão de cassetes de genes que conferem resistência aos antibióticos. Cassetes de genes são elementos genéticos que podem existir como moléculas livres, circulares, de DNA não replicável. No entanto, normalmente são encontradas como sequências lineares que fazem parte de uma molécula de DNA maior, tal como um plasmídeo ou cromossoma bacteriano. Normalmente as cassetes contêm apenas um único gene de resistência a antibióticos e uma curta sequência adicional chamada elemento de 59 pares de bases (59-be), (também designado de *attC*) que funciona como um local de recombinação específica, que varia consideravelmente de tamanho e é responsável pela mobilidade da cassette. O tamanho das cassetes varia entre 262-1549 pb, a maioria das cassetes não possui promotor pelo que os genes são expressos só quando a cassette é inserida na orientação adequada no integrão. ^{[17] [18]} ^[19]

Um integrão básico, designado *Int0* é uma estrutura que compreende a região conservada 5' diretamente ligada à região conservada 3', sem uma cassette de genes. As características essenciais da estrutura são um gene integrase, *intI*, o local de

inserção das cassetes de genes, *attI*, localizado a seguir ao *intI* e um promotor que se encontra localizado no interior do *intI* e que dirige a transcrição para o local de inserção onde os genes localizados nas cassetes são expressos. Estas características encontram-se todas na região conservada 5'. A região conservada 3' codifica para a resistência às sulfonamidas, mediada pelo gene *sulI*, *qacEΔ1* que determina resistência a brometo de etídio e compostos quaternários de amónio e duas *Open Reading Frames* (ORF), *orf5* e *orf6* que codificam para proteínas de funções desconhecidas. Novos integrões são gerados a partir da inserção de novas cassetes de genes no *attI*, ou deleção de uma mais cassetes de um integrão existente (Figura 1). Deleções, duplicações e rearranjo das cassetes já foram observados. O movimento das cassetes para dentro e fora dos integrões é um processo feito ao acaso, assim como a maioria dos arranjos genéticos em bactérias. [17] [18] [19]

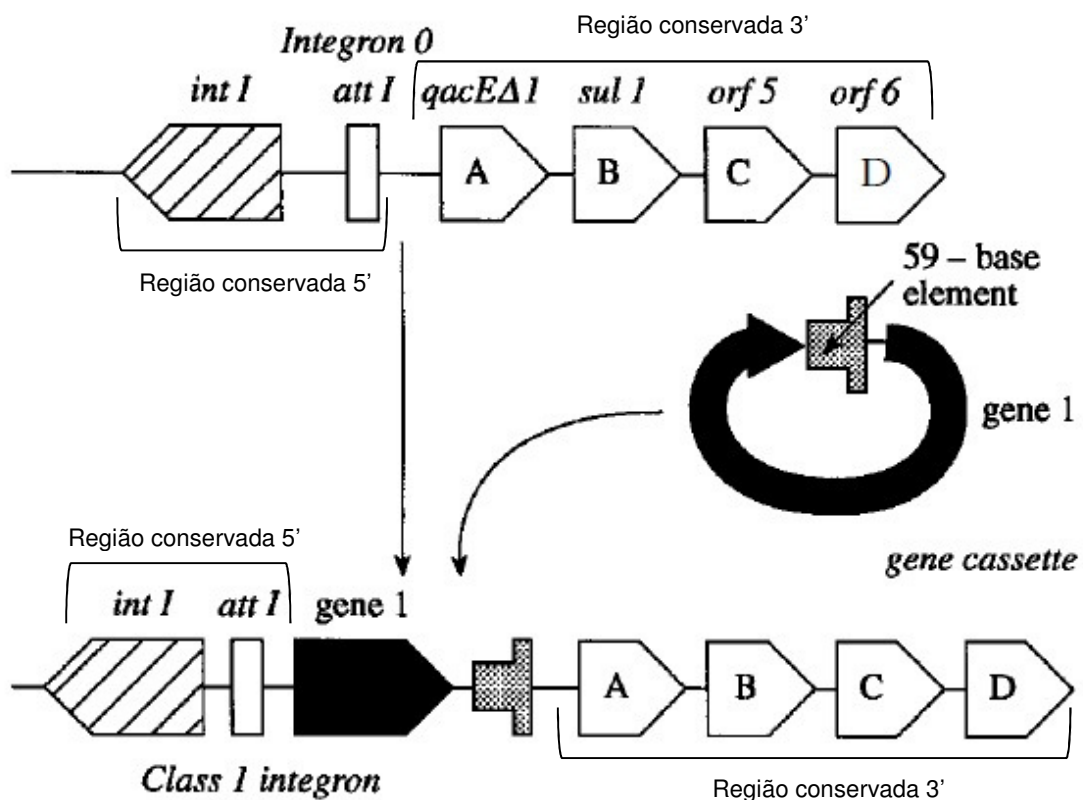


Figura 1 - Estrutura do integrão. Adaptada de Bennet, 1999. [19]

Quatro classes de integrões foram identificadas até ao momento. Cada classe tem um específico gene *intI* e local *attI*. A maioria dos integrões descritos pertence à classe 1. Embora os integrões possam mobilizar várias cassetes de genes, por si só eles não são móveis. Integrões de classe 1 são muitas vezes encontrados em transposões. Estes transposões encontram-se normalmente localizados em

plasmídeos móveis o que aumenta a disseminação dos genes de resistência aos antibióticos a bactérias da mesma espécie ou mesmo espécies diferentes. ^{[17][18]}

1.2 Principais grupos de antibióticos

Cada grupo de antibióticos tem um alvo ou alvos específicos na célula bacteriana. Existem vários grupos de antibióticos, que atuam em diferentes locais da célula bacteriana, nomeadamente antiparietais, antimembranares, inibidores da síntese proteica, inibidores da síntese dos ácidos nucleicos, antimetabolitos, nitrofuranos, antituberculosos e antilepra. ^[20]

Dentro dos antibióticos antiparietais encontram-se os glicopéptidos como a teicoplanina e a vancomicina inibidores da formação do peptidoglicano. São de origem natural, com ação bacteriolítica e são inibidores da formação do peptidoglicano na fase membranar. Estes antibióticos têm fraca atividade contra bacilos de Gram negativo devido ao seu elevado peso molecular o que impede a sua passagem através dos canais de porina existentes na membrana exterior deste tipo de bactérias. Atuam contra um grande número de bactérias de Gram positivo, incluindo bactérias pertencentes ao género *Enterococcus*. Estes antibióticos atuam através da alteração do local alvo, formam complexos com o dipeptídeo D-alanil-D-alanina da cadeia peptídica dos precursores do peptidoglicano, impedindo a transferência de unidades recém sintetizadas para a matriz parietal em crescimento, provocando a lise da célula bacteriana em crescimento. Tanto a vancomicina como a teicoplanina são de uso exclusivo hospitalar em Portugal. ^{[1][20]}

A resistência adquirida aos glicopéptidos em *Enterococcus* spp. pode dever-se a seis diferentes genótipos de resistência: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*. Os genes *vanA* e *vanB* são bastante frequentes, sendo que *vanA* ocorre em *E. faecalis*, *E. faecium* e ocasionalmente em *E. avium*, *E. durans*, *E. hirae* e *E. raffinosum*, é indutível e confere resistência à vancomicina e à teicoplanina. Já o gene *vanB* ocorre quase exclusivamente em *E. faecalis* e em *E. faecium* conferindo resistência indutível à vancomicina mas não à teicoplanina. O gene *vanC* é característico da espécie *Enterococcus* e é intrínseco das espécies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*. Os genes *vanD*, *vanE* e *vanG* foram observados num número reduzido de espécies. ^{[1][20]}

Ainda dentro dos antiparietas encontram-se os beta-lactâmicos, também eles inibidores da síntese do peptidoglicano. São uma coleção de substâncias não homogêneas na sua química, tendo apenas em comum um anel β -lactâmico. Têm o

inconveniente de poderem ser inativados por enzimas hidrolíticas bacterianas (β -lactamases). Dentro dos beta-lactâmicos incluem-se as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactams e os carbapenems. As bactérias escapam à ação destes antibióticos por 4 mecanismos: hidrólise por β -lactamases, modificação dos alvos (alteração da PBP's – *Penicillin Binding Proteins*), impermeabilização da membrana externa e bombas de efluxo.

As β -lactamases são os principais determinantes da resistência bacteriana aos antibióticos. São enzimas, cujos genes podem apresentar localização plasmídica ou cromossômica que catalizam a hidrólise do anel β -lactâmico. Alguns genes codificam para β -lactamases com um espectro de atividade reduzido, outras apresentam atividade para β -lactâmicos de largo espectro como as cefalosporinas de 3ª geração, levando ao aparecimento de β -lactamases de espectro alargado (ESBL – *Extended Spectrum β -Lactamases*). Dentro destas últimas incluem-se, por exemplo, as do tipo TEM, SHV e CTX-M. Dependendo da sua atividade, as β -lactamases podem ser designadas de penicilases, cefalosporinases ou carbapenemases. Muitas vezes os genes codificadores de β -lactamases encontram-se em integrons: elementos genéticos mobilizáveis em plasmídeos e transposões, com capacidade de adquirirem múltiplas cassetes de genes de resistência a antibióticos. ^{[1] [21]}

No que diz respeito aos antibióticos inibidores da síntese proteica temos os aminoglicosídeos como é o caso da tobramicina e a gentamicina. São muito utilizados para o tratamento de infeções provocadas por bactérias de Gram positivo (*Enterococcus*) e de Gram negativo (*Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*), são normalmente usado juntamente com antibióticos antiparietais ou glicopéptidos. Após atingir o citoplasma bacteriano, o antibiótico liga-se à subunidade 30S ribossomal, causando alterações na síntese proteica.

A modificação enzimática das moléculas destes antibióticos constitui o mecanismo mais frequente de resistência observada em estirpes clínicas embora também existam outros mecanismos de resistência, como alteração dos ribossomas por mutação (alteração do local alvo) e impermeabilização da membrana citoplasmática (reduzida capacidade de atravessar os invólucros bacterianos para atingir o citoplasma). ^{[20] [21] [22]}

As tetraciclinas são antibióticos de largo espectro, ativas contra bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. O seu baixo custo e fácil aplicação fazem com que as tetraciclinas sejam largamente consumidas quer na medicina quer na veterinária. As tetraciclinas inibem primariamente a síntese proteica, atuando ao nível da

subunidade 30S dos ribossomas. Classificam-se como bacteriostáticos uma vez que apenas inibem o crescimento bacteriano. Os determinantes genéticos podem ser de origem cromossómica, sendo mais frequentes em plasmídeos ou em transposões o que facilita a sua disseminação. Os mecanismos de resistência às tetraciclina descritos para *Enterococcus* são: bombas de efluxo que são codificadas pelos genes *tetK* e *tetL*. Estas bombas expulsam o antibiótico para o exterior não permitindo que ele se acumule no citoplasma. O outro mecanismo é um sistema de proteção ribossomal constituídos por proteínas que ao interagir com o ribossoma o deixam insensível à inibição das tetraciclina. Este mecanismo é codificado pelos genes *tetM*, *tetO* e *tetS*.^{[1] [20] [22]}

Os macrólidos inibem a síntese proteica ao ligar-se à subunidade 50S do ribossoma. Tal como as tetraciclina têm uma atividade bacteriostática e uma grande atividade face a bactérias de Gram positivo. A resistência aos macrólidos pode ser mediada por vários mecanismos e genes. Um dos mecanismos mais disseminados é a alteração do local alvo, mediada pelos genes *erm*. De facto a diminuição de suscetibilidade a macrólidos em *Enterococcus* spp. devido à presença de *ermB* é das mais disseminadas nos vários nichos onde se estudam estas bactérias, tendo sido detetado em isolados clínicos, frangos e suínos. Outros mecanismos de resistência incluem a inativação enzimática e bombas de efluxo, codificadas pelos genes *ere* e *mef* respetivamente.^{[1] [20] [21] [22] [23]}

As quinolonas, como é o caso da ciprofloxacina (quinolona de segunda geração), são ativas contra bactérias de Gram negativo tendo pouca atividade contra bactérias de Gram positivo. Elas inibem as enzimas responsáveis pelo enrolamento do DNA processo fundamental na replicação deste. As bactérias podem resistir à ação destes antibióticos através de impermeabilização da membrana exterior, alterações no local alvo e através de bombas de efluxo.^{[20] [22]}

A quinopristina/dalfopristina usam-se na terapêutica associadas, inibem a síntese proteica com uma ligação à subunidade 50S do ribossoma. No que diz respeito à resistência à quinopristina, pensa-se que possa ser similar à dos macrólidos e no caso da dalfopristina que se deve à degradação enzimática.^{[20] [22]}

Alguns estudos já foram realizados em locais remotos como na Bolívia, onde foram encontradas altos níveis de resistência a antibióticos em isolados comensais de *Escherichia coli*.^[11] Também na região da Beringia em amostras fecais de pássaros foram detetados níveis de resistência a vários antibióticos.^[24] Ainda outros estudos

feitos em diferentes animais demonstraram elevados níveis de resistência a antibióticos. [2] [6] [25] [26]

Na presente tese as amostras utilizadas foram uma oportunidade única de estudo, uma vez que pertencem a animais endémicos da região de Xinjiang e do Planalto Tibetano nunca antes estudadas.

2. Objetivos

Atualmente, a emergência e evolução da resistência a agentes antimicrobianos constituem um dos fenómenos mais preocupantes de Saúde Pública, tendo vindo, nos últimos anos, a representar um desafio constante à escala mundial. O hospital é sem dúvida um dos nichos ecológicos mais importantes na promoção do aparecimento de elevados níveis de resistências. Contudo, permanece, pouco esclarecida a origem de alguns dos mecanismos de resistência adquiridos com maior relevância clínica, bem como a sua associação a bactérias de nichos ecológicos extra-hospitalares.

Tendo em conta que o papel dos animais selvagens neste complexo processo de disseminação da resistência não está claramente estabelecido, o estudo da fauna selvagem endémica que habita regiões remotas e muitas vezes exóticas, com a caracterização da flora microbiana associada, torna-se uma das abordagens mais lógicas e importantes para a deteção e/ou identificação de novos mecanismos de resistência. Assim, constituíram objetivos do presente trabalho:

- Caracterizar a flora microbiana associada a diferentes espécies animais selvagens da região de Xinjiang e do burro selvagem tibetano (*Equus kiang*) que habita o Planalto Tibetano.
- Estudar a suscetibilidade das bactérias isoladas, das diferentes amostras de fezes animais, a vários grupos de antibióticos, identificando a presença de bactérias resistentes.
- Caracterizar os determinantes genéticos associados aos vários fenótipos de resistência identificados.
- Investigar e identificar a associação dos determinantes genéticos de resistência aos antibióticos a elementos de captura genética móveis, facilitadores e promotores da disseminação horizontal da resistência.
- Contribuir para o conhecimento do papel dos animais selvagens, alguns em vias de extinção, como potencial reservatório e fonte de bactérias resistentes a antibióticos fora do ambiente hospitalar.

3. Material e Métodos

3.1 Caracterização do local de amostragem e origem das amostras

No presente trabalho, foram utilizadas amostras de fezes de várias espécies animais selvagens icónicas, algumas consideradas ameaçadas ou em vias de extinção, que habitam uma das regiões mais remotas do globo, a região de Xinjiang na China e do Planalto Tibetano, a região mais alta do mundo (Figura 2).



Figura 2 - Região de Xinjiang e Planalto Tibetano.

Parte das amostras de fezes (n=32), de vários animais selvagens (Tabela 1; Figura 3), foi recolhida no decurso de uma recente expedição, a “Silk Road 2010 Expedition”, levada a cabo por uma equipa de investigadores do CIBIO (Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos) juntamente com a Chinese Academy of Sciences, à Região Autónoma de Xinjiang Uyghur, localizada na China.

As restantes 32 amostras (Tabela 1) foram obtidas no contexto de uma colaboração entre um grupo de investigação do CIBIO e investigadores locais no Tibete, que procederam à recolha de fezes de *Equus kiang*, o burro selvagem tibetano. Este equídeo, o maior dos burros selvagens, é uma espécie endémica do Tibete, considerado um dos últimos territórios de vida selvagem do Oriente. Estas amostras foram recolhidas em diferentes reservas naturais do Planalto Tibetano, onde o *kiang*

habita: Tingri (n=14), Nyalam (n=4), Gyirong (n=6) e Nagqu (n=8), localizações caracterizadas por população humana inexistente ou extremamente baixa.

Tabela 1 - Espécies animais amostradas e respetiva classificação do estado de conservação

Espécie animal	Estado de Conservação ^a	Nº de amostras
Marmota cinzenta (<i>Marmota baibacina</i>)	De menor preocupação	7
Camelo bactriano (<i>Camelus bactrianus</i>)	Criticamente ameaçado	8
Burro selvagem da Mongólia (<i>Equus hemionus</i>)	Ameaçado	4
Lobo tibetano (<i>Canis lupus</i>)	De menor preocupação	3
Cão selvagem asiático (<i>Cuon alpinus</i>)	Ameaçado	1
Urso castanho (<i>Ursus arctos</i>)	De menor preocupação	1
Cavalo Przewalski (<i>Equus ferus przewalskii</i>)	Ameaçado	6
Gazela (<i>Procapra gutturosa</i>)	De menor preocupação	1
Cabra selvagem (<i>Capra aegagrus aegagrus</i>)	Vulnerável	1
Burro selvagem tibetano (<i>Equus kiang</i>)	De menor preocupação	32

^a de acordo com a classificação do "The IUCN Red List of Threatened species" ^[27]



Figura 3 - Alguns exemplares dos animais selvagens amostrados (A - Marmota cinzenta; B - Camelo bactriano; C - Burro selvagem da Mongólia; D - Lobo tibetano; E - Cão selvagem asiático; F - Cavalo Przewalski).

A região de Xinjiang, uma área pouco povoada e que se estende por mais de 1,6 milhões de km², é habitada por diferentes grupos étnicos, tendo sido, no passado, atravessada pelo norte da Rota da Seda, que cruzava o deserto icónico de Taklamakan (Figura 4). É uma vasta região isolada, caracterizada por ambientes distintos, habitats incluindo deserto, semi-deserto e tundra. Algumas destas áreas são consideradas, à parte das regiões polares, das menos povoadas do mundo e, durante a expedição, não foram vislumbrados sinais de presença humana. O acesso a esta região remota é extremamente difícil e limitado, tendo sido necessárias autorizações oficiais especiais para entrar em determinadas áreas.



Figura 4 - Diferentes áreas percorridas, durante mais de 5000 Km, no decurso da expedição "Silk Road 2010 Expedition", onde foram recolhidas as diversas amostras de fezes de animais selvagens.

As amostras de fezes dos animais foram recolhidas com material estéril, colocadas em meio de cultura líquido (TSB - *Tryptic Soy Broth*) e transportadas à temperatura ambiente, transporte esse que demorou cerca de 1 semana. Uma vez no laboratório as amostras foram conservadas a -80°C.

3.2 Obtenção dos isolados

As amostras de fezes foram pré-enriquecidas em *Buffered Peptone Water* de acordo com procedimentos *standard* (ISO 6579) ^[28] e alíquotas destas suspensões (0,1 ml) foram semeadas à superfície de placas de Petri contendo diferentes meios de

cultura seletivos (Slannetz-Bartley Agar para *Enterococcus* spp., MacConkey Agar para *Enterobacteriaceae* e outros bacilos de Gram negativo) suplementados e não suplementados com diferentes antibióticos. A descrição dos meios de cultura, dos agentes antimicrobianos e respetivas concentrações, utilizados no processo de seleção de bactérias, encontra-se na Tabela 2. As placas foram incubadas a 37°C/24h, tendo-se repicado e guardado uma colónia de cada morfologia.

Tabela 2 - Agentes antimicrobianos utilizados na suplementação das placas e as suas respetivas concentrações

Meio de Cultura	Agentes antimicrobianos	Concentrações (µg/ml)
MacConkey Agar	Cefotaxima	2
	Ceftazidima	2
	Imipenemo	1
	Tetraciclina	8
	Ciprofloxacina	0,125
Slanetz-Bartley Agar	Tetraciclina	8
	Vancomicina	4
	Gentamicina	125
	Amoxicilina	16
	Ciprofloxacina	4

Paralelamente, foi também realizada a pesquisa de *Salmonella* de acordo com os procedimentos descritos na norma ISO 6579. ^[28]

Após o isolamento, as bactérias foram conservadas em TSB com 20% de glicerol a -80°C para posterior caracterização.

3.3 Identificação dos isolados obtidos

A identificação das colónias foi realizada através de provas bioquímicas clássicas (por ex. coloração de Gram, oxidase, fermentação de açúcares, etc.), sistemas de identificação miniaturizados API 32GN e, no caso das bactérias presuntivamente identificadas como *Enterococcus*, por reações de PCR.

Os *primers* utilizados para identificação de género e espécie, assim como as concentrações dos reagentes e as condições de amplificação estão descritas nas Tabelas 3 e 4.

3.4 Avaliação da suscetibilidade a agentes antimicrobianos

Para fazer a avaliação da suscetibilidade a diferentes agentes antimicrobianos, de cada isolado obtido, foi usado o método de difusão em agar com discos (método de Kirby-Bauer), seguindo as normas e critérios definidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).^[29] É o processo mais comumente empregue na avaliação da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos. A sua simplicidade, rapidez, economia e reprodutibilidade, fazem dele um processo bastante conveniente. Pequenos discos de papel, impregnados com quantidades conhecidas de antibiótico, são colocados na superfície de uma placa, contendo um meio de cultura sólido, previamente inoculado com uma cultura da bactéria a testar. Após um período de incubação, as placas são examinadas, verificando-se as zonas de inibição de crescimento em redor dos discos. Uma zona de inibição de crescimento significa que o organismo foi inibido pelo fármaco que se difundiu no agar. A ausência de um halo de inibição de crescimento indica que o organismo é resistente ao antibiótico. O antibiograma interpreta a sensibilidade das bactérias aos antibióticos em termos de eficácia clínica: a bactéria é classificada nas categorias sensível (S), intermédia (I) ou resistente (R), de acordo com a medida do halo de inibição obtida e da sua interpretação com o auxílio de tabelas.

Preparou-se uma suspensão bacteriana da cada estirpe em estudo, de turvação comparável a 0,5 McFarland. Mergulhou-se a zaragatoa na suspensão e semearam-se placas de agar Mueller Hilton II. Posteriormente, colocaram-se os discos contendo os antibióticos a testar sobre a superfície do meio inoculado e incubaram-se as placas a 37°C, durante cerca de 18 horas. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição de crescimento foram medidos e, recorrendo às tabelas do CLSI, foi possível classificar a estirpe, de acordo com a inibição observada, nas categorias sensível, intermédia ou resistente. Nesta determinação, os discos de antibióticos (OXOID) utilizados foram escolhidos de acordo com os grupos taxonómicos em estudo, tentando sempre utilizar pelo menos um representante de cada grupo terapêutico.

Para os isolados resistentes à amoxicilina, a presença de um fenótipo indicativo da produção de β -lactamases de espectro alargado foi determinada pela prova da ação sinérgica de dois discos.^[30] Os fenómenos de sinergismo foram avaliados segundo a técnica de difusão em agar com disco,^[29] aplicando um disco de amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 μ g) próximo de discos de ceftazidima (30 μ g) e cefotaxima (30 μ g) na placa de Mueller Hinton (bioMérieux).

3.5 Caracterização de genes de resistência a antibióticos

No presente trabalho foram pesquisados por PCR genes que codificam para a resistência a vários grupos de antibióticos.

3.5.1 Condições gerais das reações de amplificação de DNA por PCR

3.5.1.1 Preparação do DNA bacteriano

Dadas as diferenças morfológicas entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, a obtenção do DNA cromossômico foi conduzida de forma distinta, conforme os isolados em estudo. Assim, no caso das bactérias presuntivamente identificadas como *Enterococcus*, sujeitas a PCR, estas foram previamente isoladas em BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 37°C durante 24h. Posteriormente, foi preparada uma suspensão bacteriana em água ultra pura estéril, cuja turvação foi ajustada para um valor superior a 2 McFarland, sendo que 2 µl dessa suspensão foram adicionados diretamente à mistura reacional do PCR. O DNA foi, desta forma, obtido através de lise bacteriana num passo prévio à reação de PCR.

No caso das bactérias de Gram negativo, o DNA cromossômico das estirpes em estudo foi obtido utilizando um método de lise por fervura. De cada uma das estirpes cultivadas em meio sólido, durante 24 h, retiraram-se 2 a 3 colónias com uma ansa e suspenderam-se em 100 µl de água ultra pura estéril. Posteriormente, colocou-se em banho-maria a 95°C durante 15 min. Centrifugou-se a 13000 rpm, durante 3 min e os sobrenadantes, contendo o DNA, foram conservados a -20°C para utilização posterior nas várias reações de PCR.

3.5.1.2 Condições de amplificação

Os *primers*, reagentes, temperaturas, tempos e ciclos necessários à amplificação estão descritos nas Tabelas 3, 4, 5 e 6. O termociclador utilizado foi o *MyCycler Thermal Cycler* (BioRad) ou *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystem). Os *primers* específicos para cada reação de PCR foram sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies*.

Para as bactérias do género *Enterococcus*, que apresentavam resistência à tetraciclina e à eritromicina, foram pesquisados genes de resistência aos macrólidos e às tetraciclinas. Estes genes foram pesquisados por PCR utilizando *primers*, concentração de reagentes e condições de amplificação descritas nas Tabelas 3 e 4.

Relativamente às bactérias de Gram negativo, com resistência à amoxicilina e cefotaxima, foram pesquisados os genes de resistência *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}. Foi também pesquisada a presença de integrões de classe 1 em bactérias cujos fenótipos de suscetibilidade indicavam a possível presença de genes de resistência comumente localizados neste tipo de plataforma genética. Os genes e a presença de integrões foram pesquisados por PCR utilizando *primers*, concentração de reagentes e condições de amplificação descritas nas Tabelas 5 e 6.

3.5.1.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos obtidos nas reações de PCR foram separados por eletroforese em geles de agarose a 2% em tampão TBE (*tris-borate, EDTA buffer*) 0,5X a 100V durante cerca de 35 minutos. Os geles foram corados com *GelRed* e o tamanho dos fragmentos obtidos foi calculado por comparação da sua mobilidade com o marcador de peso molecular utilizado (100bp DNA *Ladder*, *Invitrogen* ou 1kb DNA *Ladder*, *SolisBiodyne*).

Tabela 3 - Descrição da sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reações de PCR para *Enterococcus* spp.

Objetivo	<i>Primers</i> (sequência 5'→ 3')	Referência
Identificação do género	<i>Ent1</i> – TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G <i>Ent2</i> – AAC TTC GTC ACC AAC GCG GAA C	31
Identificação da espécie	<i>E1</i> – ATC AAG TAC AGT TAG TCT T <i>E2</i> – ACG ATT CAA AGC TAA CTG <i>F1</i> – GCA AGG CTT CTT AGA GA <i>F2</i> – CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	32
Caracterização dos genes de resistência a macrólidos	<i>ermA1</i> – TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA <i>ermA2</i> – TGA TTA TAA TTA TTT GAT AGC TTC <i>ermB1</i> – CAT TTA ACG ACG AAA CTG GC <i>ermB2</i> – GGA ACA TCT GTG GTA TGG CG <i>ermC1</i> – TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA <i>ermC2</i> – TAA CTG CTA AAT TTG TTA TAA TCG	23 e 33
Caracterização dos genes de resistência a tetraciclinas	<i>tetM-1</i> – GTT AAA TAG TGT TCT TGG AG <i>tetM-2</i> – CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA <i>tetL-2-1</i> – CAT TTG GTC TTA TTG GAT CG <i>tetL-2-2</i> – ATT ACA CTT CCG ATT TCG G <i>tetO-1</i> – GAT GGC ATA CAG GCA CAG AC <i>tetO-2</i> – CAA TAT CAC CAG AGC AGG CT	34

Tabela 4 - Descrição dos *primers*, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para as diferentes reações de PCR para *Enterococcus* spp.

Objetivo	<i>Primers</i>	Reagentes	Condições do Termociclador	Tamanho do produto amplificado
Identificação do Género	<i>Ent1</i> e <i>Ent2</i>	Tampão de PCR 1x, 1,5mM MgCl ₂ , 0,2mM de cada dNTP, 2µl de cada <i>primer</i> , 0,5U de Taq Polimerase e 2µl de DNA	94°C-10 min (1 ciclo); 94°C-30s, 58°C-30s, 72°C-30s (30 ciclos); 72°C-10 min (1 ciclo)	112pb
Identificação da espécie	<i>E1</i> , <i>E2</i> , <i>F1</i> , <i>F2</i>			<i>E1E2</i> (941pb); <i>F1F2</i> (550pb)
Caracterização dos genes de resistência aos macrólidos	<i>ermA1</i> , <i>ermA2</i> , <i>ermB1</i> , <i>ermB2</i> , <i>ermC1</i> , <i>ermC2</i>	Tampão de PCR 1x, 1,5mM MgCl ₂ , 0,2mM de cada dNTP, 2µl de cada <i>primer</i> , 0,5U de Taq Polimerase e 2µl de DNA	94°C-10 min (1 ciclo); 94°C-1min, 50°C-1min, 72°C-1min (35 ciclos); 72°C-10 min (1 ciclo)	<i>ermA</i> (645pb) <i>ermB</i> (424pb) <i>ermC</i> (642pb)
Caracterização dos genes de resistência às tetraciclina	<i>tetL-2-1</i> , <i>tetL-2-2</i> , <i>tetM-1</i> , <i>tetM-2</i> , <i>tetO-1</i> , <i>tetO-2</i>	Tampão de PCR 1x, 1,5mM MgCl ₂ , 0,2mM de cada dNTP, 2µl de cada <i>primer</i> , 0,5 U de Taq Polimerase e 2µl de DNA	94°C-10 min (1 ciclo); 94°C-30s, 53°C-30s, 72°C-30s (25 ciclos); 72°C-10 min (1 ciclo)	<i>tetL</i> (475pb) <i>tetM</i> (657pb) <i>tetO</i> (634pb)

Tabela 5 - Descrição da sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reações de PCR para bactérias de Gram negativo

Objetivo	<i>Primers</i> (sequência 5'→ 3')	Referência
Pesquisa de <i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F' – TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA CTX-M-R' – CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A	35
Pesquisa de <i>bla</i> _{TEM}	TEM-F – ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG TEM-R – CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA	35
Pesquisa de <i>bla</i> _{SHV}	SHV-F - GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC SHV-R - TTA GCG TTG CCA GTG CTC	36
Presença de integroões de classe 1	Int5'CS – GGC ATC CAA GCA GCA AG Int3'CS – AAG CAG ACT TGA CCT GA	37

Tabela 6 - Descrição dos *primers*, reagentes, condições de amplificação e tamanho do produto esperado para as diferentes reações de PCR para bactérias de Gram negativo

Objetivo	<i>Primers</i>	Reagentes	Condições do Termociclador	Tamanho do produto amplificado
Pesquisa de <i>bla</i>_{CTX-M}	CTX-M-F', CTX-M-R'	PCR SuperMix, 300nM de cada <i>primer</i> e 2 µl de DNA	94°C-10 min (1 ciclo); 94°C-1 min, 51°C-1 min, 72°C-1 min (35 ciclos); 72°C-10 min (1 ciclo)	CTX-M (590 pb)
Pesquisa de <i>bla</i>_{TEM}	TEM-F, TEM-R		94°C-10 min (1 ciclo); 94°C-1 min, 58°C-1 min, 72°C-1 min (35 ciclos); 72°C-10 min	TEM (847 pb)
Pesquisa de <i>bla</i>_{SHV}	SHV-F, SHV-R		94°C-12 min (1 ciclo); 94°C-1 min, 56°C-1 min, 72°C -1 min (35 ciclos); 72°C- 10 min	SHV (930pb)
Presença de integrrões de classe 1	Int5'CS, Int3'CS		94°C-5 min (1 ciclo); 94°C-1 min, 53°C-1 min, 72°C-6 min (35 ciclos); 72°C-16 min (1 ciclo)	De acordo com a estrutura do integrão

4. Resultados e Discussão

4.1 Isolados obtidos

No presente trabalho foram utilizadas 64 amostras de fezes de diferentes espécies animais selvagens, que habitam uma das mais remotas regiões do planeta, a região de Xinjiang e do Planalto Tibetano, na China, localizações caracterizadas por população humana inexistente ou extremamente baixa e elevadas altitudes. Após o processo de seleção em meios de cultura suplementados e não suplementados com antibióticos, foi possível obter 696 isolados (378 provenientes de animais da região de Xinjiang e 318 provenientes do burro selvagem tibetano). Desta forma, foi possível obter e conservar uma importante coleção de bactérias, representativa da flora associada a espécies animais icônicas, algumas enfrentando risco de extinção (caso, por exemplo do camelo bactriano, o cavalo Przewalski e do burro selvagem da Mongólia), outras praticamente desconhecidas (ironicamente o caso do maior dos burros selvagens, o *kiang*). Tanto quanto se sabe, a informação sobre as comunidades bacterianas que habitam estes animais é escassa ou praticamente inexistente, e o seu contributo para a dinâmica da resistência aos antibióticos não está estabelecido, pelo que esta coleção de bactérias constituiu certamente uma valiosa oportunidade de estudar o fenómeno da resistência associado a espécies endémicas de uma das áreas mais remotas do nosso planeta.

Nas Tabelas 7 e 8 encontra-se a distribuição do número de bactérias isoladas das várias amostras de fezes provenientes dos diferentes animais selvagens, recolhidas na região de Xinjiang e do Planalto Tibetano.

Tabela 7 – Isolados obtidos a partir das amostras de animais provenientes da região de Xinjiang

Animal	Amostras (nº)	Isolados (nº)	Gram positivos (nº)	Gram negativos	
				Fermentadores da Lactose (nº)	Não fermentadores da Lactose (nº)
Burro selvagem da Mongólia	4	59	14	12	33
Cão selvagem asiático	1	7	6	1	0
Urso castanho	1	5	4	1	0
Gazela	1	11	3	2	6
Lobo tibetano	3	30	18	8	4
Cavalo Przewalski	6	67	22	27	18
Marmota cinzenta	7	89	33	25	31
Camelo bactriano	8	100	36	34	30
Cabra selvagem	1	10	5	4	1
Total	32	378	141	114	123

Tabela 8 – Isolados obtidos das amostras do *kiang* provenientes da região do Planalto Tibetano

Zona	Amostras (nº)	Isolados (nº)	Gram positivos (nº)	Gram negativos	
				Fermentadores da Lactose (nº)	Não fermentadores da Lactose (nº)
Tingri	14	136	62	40	34
Nyalam	4	42	20	11	11
Gyirong	6	61	23	21	17
Nagqu	8	79	36	27	16
Total	32	318	141	99	78

4.2 Identificação dos Isolados obtidos

Das 64 amostras de fezes, utilizadas no presente estudo, foi possível isolar 696 estirpes bacterianas, que inicialmente foram distinguidas de acordo com o seu comportamento face à coloração de Gram, tendo-se obtido um total de 282 bactérias de Gram positivo e 414 bacilos de Gram negativo, pertencentes a diferentes espécies, como descrito na Tabela 9.

Tabela 9 -Identificação dos isolados provenientes da região de Xinjiang e do Planalto Tibetano

Espécie	Nº de isolados
Isolados obtidos das amostras da região de Xinjiang	
<i>Enterococcus</i> sp.	23
<i>Enterococcus faecium</i>	42
<i>Enterococcus faecalis</i>	14
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3
<i>Delftia acidovorans</i>	2
<i>Rhizobium radiobacter</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	1
Outros isolados de Gram positivo não identificados	62
Outros isolados de Gram negativo não identificados (fermentadores da lactose)	94
Outros isolados de Gram negativo não identificados (não fermentadores da lactose)	111
Isolados obtidos das amostras do Planalto Tibetano	
<i>Enterococcus</i> sp.	22
<i>Enterococcus faecium</i>	8
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Pantoea</i> spp.	1
<i>Achromobacter denitrificans</i>	4
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1
Outros isolados de Gram positivo não identificados	111
Outros isolados de Gram negativo não identificados (fermentadores da lactose)	97
Outros isolados de Gram negativo não identificados (não fermentadores da lactose)	73

A pesquisa seletiva de bactérias do género *Salmonella* segundo a norma internacional ISO ^[28] realizada para as diferentes amostras de fezes anteriormente mencionadas revelou-se negativa.

4.3 Avaliação da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados obtidos

4.3.1 Avaliação da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos em isolados provenientes das amostras da região de Xinjiang

Das 378 bactérias isoladas a partir das amostras de fezes de animais endémicos da região de Xinjiang, foi possível verificar que 235 delas (62,2%) apresentam fenótipos de resistência aos antibióticos. Curiosamente, enquanto algumas dessas bactérias - 21,4% (81) - apresenta resistência a um só antibiótico, a

maioria - 40,7% (154) - manifesta um fenótipo de resistência múltipla (variando entre 2 a 5 agentes antimicrobianos).

No caso das bactérias de Gram positivo, foram obtidos 141 isolados, sendo que 103 apresentaram uma diminuição da suscetibilidade a um ou vários antibióticos.

Foram detetadas taxas variáveis de resistência aos diferentes antibióticos testados para estirpes de *Enterococcus* spp: tetraciclina - 76% (60/79), eritromicina - 57% (45/79), amoxicilina - 18% (14/79), vancomicina - 10% (8/79), quinopristina/dalfopristina - 34% (27/79), gentamicina - 22% (17/79).

Dos 237 bacilos de Gram negativo isolados a partir das amostras de fezes dos animais provenientes da região de Xinjiang, foi possível identificar a presença de 114 isolados com capacidade de fermentar a lactose (vários identificados como *E. coli*) e 123 bacilos não fermentadores da lactose.

Uma elevada percentagem de bacilos de Gram negativo fermentadores da lactose (46,5%) apresentaram diminuição de suscetibilidade a um ou vários agentes antimicrobianos e, em algumas situações, os perfis de suscetibilidade eram idênticos aos exibidos por estirpes tipicamente hospitalares. Detetaram-se taxas de resistência variáveis aos diferentes antibióticos testados: amoxiciclina - 40,4% (46/114), amoxicilina/ácido clavulânico - 13,6% (14/103), cefotaxima - 8,7% (9/103), gentamicina - 6,25% (1/16), ciprofloxacina - 15% (17/114), tetraciclina - 43,75% (7/16), tobramicina - 12,2% (12/98). Dos 114 isolados, 15 deles, a maioria com resistência a beta-lactâmicos e aminoglicosídeos foram identificados como *E. coli*. Um estudo efetuado em animais selvagens no México e na Austrália demonstrou uma maior frequência de resistência a antibióticos nos isolados provenientes do México.^[5] Sugeriu-se que essa diferença se deva à ampla ocupação humana e uso de antibióticos no México, assim como, possíveis pressões seletivas nos animais hospedeiros. As aves selvagens são um reservatório de bactérias resistentes com potencial para disseminação de longa distância. Proximidade à atividade humana aumenta o número de bactérias resistentes associadas com aves selvagens. Por exemplo gaivotas e gansos que fazem ninhos perto de águas residuais albergam mais *E. coli* resistente do que aves associadas a águas não poluídas.^[5] Através da migração, as aves podem disseminar a resistência a outros ambientes aparentemente sem contacto com antibióticos.

No que diz respeito aos bacilos de Gram negativo não fermentadores da lactose, 80 (65%) isolados apresentaram diminuição de suscetibilidade a um ou vários

antibióticos. Foram observadas diferentes taxas de resistência aos antibióticos testados: amoxicilina (63%), ceftazidima (7,4%), gentamicina (24,8%) e tobramicina (22,5%). Dos 80 isolados, 2 apresentaram um fenótipo de resistência ao imipenemo. Um *Proteus mirabilis* obtido de uma marmota cinzenta e uma *Brevundimonas vesicularis* proveniente de um camelo bactriano. Entre 2006 e 2009 foram detetados 22 casos de infeções por *B. vesicularis* num hospital no sul de Taiwan. Após avaliação da sua suscetibilidade aos antibióticos verificou-se que 90,9% dos isolados eram suscetíveis ao imipenemo, cefpirome e piperacilina/tazobactam, 86,4% eram suscetíveis à gentamicina, amicacina e ciprofloxacina, 63,6% suscetíveis à ceftazidima e 59,1% suscetível ao trimetoprim-sulfametoxazole.^[38] Os isolados clínicos de *P. mirabilis*, não produzem β -lactamases sobre condições de crescimento usuais. No entanto, já foi identificada resistência aos carbapenemos em *Proteus* spp. mediada por OXA-23 e VIM-1. Em 2009 foi isolado um *P. mirabilis* num hospital da China, após avaliação da suscetibilidade verificou-se que este era resistente a todos os agentes testados, tendo sido confirmada a presença de *bla*_{KPC} (*K. pneumoniae* carbapenemase, que confere resistência aos carbapenemos).^[39] Também na Grécia, em isolados de um hospital foi encontrado um *P. mirabilis* contendo uma β -lactamase do tipo *bla*_{TEM}.^[40] Alguns isolados identificados como *Delftia acidovorans* apresentaram fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos, assim como já foi reportado para isolados clínicos.^[41]

Sendo o imipenemo um antibiótico de utilização restrita ao ambiente hospitalar, o facto de se terem encontrado bactérias com resistência a essa molécula em animais provenientes de ambientes tão remotos, com influência humana extremamente reduzida, reveste-se de grande importância e sugere que a resistência aos antibióticos está longe de estar confinada aos hospitais e poderá estar disseminada nas mais remotas áreas do globo.

4.3.2 Avaliação da suscetibilidade em isolados provenientes das amostras de *Equus kiang*

A partir das amostras de fezes de *Equus kiang*, foi possível obter 318 isolados, 144 deles com fenótipo de resistência aos antibióticos testados (45,3%), variando entre resistência a um só antibiótico (34%) e a múltiplos agentes antimicrobianos (11,3%).

Relativamente, às bactérias de Gram positivo, foram obtidos 141 isolados, sendo que 46 apresentaram uma diminuição da suscetibilidade a um ou vários antibióticos.

Detetaram-se taxas variáveis de resistência aos diferentes antibióticos testados para estirpes de *Enterococcus* spp: tetraciclina - 10% (3/30), eritromicina – 10% (3/30), amoxicilina – 3,3% (1/30), vancomicina – 37% (11/30), quinopristina/dalfopristina – 77% (23/30).

Vários estudos demonstram uma elevada taxa de *Enterococcus* resistentes à vancomicina e à tetraciclina em vários ambientes distintos, entre eles encontram-se o ambiente hospitalar, águas residuais provenientes de hospitais e em locais de criação de suínos. ^[42] ^[43] ^[44] Estes resultados permitem verificar que existe uma elevada disseminação de estirpes resistentes em locais onde o uso dos antibióticos é intensivo, pelo que a existência de níveis de resistência em locais remotos revela-se de grande importância para caracterizar os determinantes genéticos associados aos vários fenótipos de resistência observados.

Relativamente aos 177 bacilos de Gram negativo isolados a partir das amostras de fezes do *kiang*, foi possível identificar 99 isolados com a capacidade de fermentar a lactose e 78 bacilos não fermentadores da lactose (alguns identificados como *Achromobacter denitrificans*).

Dos isolados com capacidade para fermentar a lactose 35,4% apresentaram diminuição de suscetibilidade a um ou vários agentes antimicrobianos. Taxas de resistência variáveis foram detetadas para os diferentes antibióticos testados: amoxiciclina – 33,3% (33/99), amoxicilina/ácido clavulânico – 2,02% (2/99), cefotaxima – 1,01% (1/99), ciprofloxacina – 1,01% (1/99).

No que diz respeito aos bacilos de Gram negativo não fermentadores da lactose, 81% (63/78) dos isolados apresentaram diminuição de suscetibilidade a um ou vários antibióticos. Foi possível observar taxas de resistência variáveis aos diferentes antibióticos: ceftazidima – 6,4% (5/78), tobramicina – 5,1% (4/78), ciprofloxacina – 21,8% (17/78), meropenemo – 1,3% (1/78), aztreonamo – 78,2% (61/78), gentamicina – 3,8% (3/78). Foram detetados 3 isolados resistentes à tobramicina, ciprofloxacina, gentamicina, aztreonamo e um isolado resistente à ceftazidima e ao aztreonamo, todos eles identificados como *Achromobacter denitrificans*. Tanto quanto se sabe apenas um caso de infeção por esta bactéria foi reportado. ^[45] Embora níveis de resistência a cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas tenham sido já reportados para o género *Achromobacter*, este é usualmente sensível a antibióticos comuns como o meropenemo e a ceftazidima. ^[45] Assim a presença destas bactérias em animais endémicos destas zonas remotas e com pressões humanas extremamente reduzidas vem mais uma vez reforçar a ideia de que a resistência não se encontra apenas

confinada aos hospitais e que o estudo destas bactérias pode ajudar a entender o complicado processo de emergência e disseminação de estirpes resistentes.

Ao comparar as duas áreas de amostragem, foi possível verificar que as bactérias obtidas a partir das amostras de fezes do burro selvagem tibetano apresentam, de forma genérica perfis de suscetibilidade aos antibióticos testados muito superiores aos observados para as bactérias provenientes dos animais da região de Xinjiang (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação entre as percentagens de resistência aos antibióticos dos isolados provenientes dos animais da região de Xinjiang e do Planalto Tibetano

Antibióticos	Resistências	
	Xinjiang	Planalto Tibetano
Gram positivos		
Amoxicilina	18% (14/79)	3,3% (1/30)
Gentamicina	22% (17/79)	0% (0/30)
Vancomicina	10% (8/79)	37% (11/30)
Tetraciclina	76% (60/79)	10% (3/30)
Quinopristina/dalfopristina	34% (27/79)	77% (23/30)
Eritromicina	57% (45/79)	10% (3/30)
Gram negativos fermentadores da lactose		
Tetraciclina	43,75% (7/16)	0% (0/0)
Amoxicilina	40,4% (46/114)	33,3% (33/99)
Amoxicilina/Ácido clavulânico	13,6% (14/103)	2,02% (2/99)
Cefotaxima	8,7% (9/103)	1,01% (1/99)
Tobramicina	12,2% (12/98)	0% (0/99)
Ciprofloxacina	15% (17/114)	1,01% (1/99)
Gentamicina	6,25% (1/16)	0% (0/0)
Gram negativos não fermentadores da lactose		
Amoxicilina/Ácido clavulânico	23,9% (16/67)	0% (0/0)
Ceftazidima	7,4% (5/68)	6,4% (5/78)
Imipenemo	5,7% (6/106)	0% (0/78)
Tobramicina	22,5% (20/89)	5,1% (4/78)
Ciprofloxacina	10,6% (13/123)	21,8% (17/78)
Amoxicilina	63% (53/84)	0% (0/0)
Aztreonamo	22,5% (9/40)	78,2% (61/78)
Gentamicina	24,8% (28/113)	3,8% (3/78)
Tetraciclina	37,1% (13/35)	0% (0/0)
Meropenemo	0% (0/79)	1,3% (1/78)

No caso do burro selvagem da Mongólia (*Equus hemionus*) e do burro selvagem tibetano (*Equus kiang*) existe a dúvida se estes dois animais pertenceram à mesma espécie ou a espécies diferentes. Estudos, no sentido de resolver essa dúvida estão inclusive a ser realizados por investigadores do CIBIO. Independentemente desta situação, eles encontram-se separados por quilómetros de distância e encontram-se a altitudes bastante diferentes. Enquanto *E. hemionus* se encontra na

zona do semi-deserto do Gobi, *E. kiang* encontra-se no Planalto Tibetano entre os 2000 e os 5000 metros de altitude. Esta diferença pode influenciar o facto das bactérias provenientes do *kiang* apresentarem perfis de suscetibilidade mais elevados e a um maior número de antibióticos.

4.4 Caracterização dos genes de resistência

4.4.1 Caracterização da resistência à tetraciclina

4.4.1.1 Isolados obtidos das amostras de Xinjiang

Relativamente à resistência à tetraciclina foram pesquisados 3 genes que possivelmente conferem resistência a este antibiótico para todos os isolados previamente identificados como *Enterococcus*. Os genes *tetM* e *tetO* associados a um mecanismo de proteção ribossomal e *tetL* que codifica para uma bomba de efluxo.

Dos 60 isolados resistentes à tetraciclina, 12% possuem o gene *tetM*, 70% possuem os genes *tetM* e *tetL*, 10% possuem o gene *tetL* e 8% dos isolados é resistente à tetraciclina mas não apresenta nenhum dos genes testados.

Os isolados que apresentaram elevada ou intermédia suscetibilidade à tetraciclina, não apresentaram nenhum dos genes testados. Já o gene *tetO* não foi detetado em nenhum dos isolados testados. Os resultados encontram-se na Tabela 11 e a Figura 5 representa um dos géis obtidos do PCR de pesquisa para genes de resistência à tetraciclina.

Tabela 11 - Resultados da pesquisa dos genes de resistência à tetraciclina para as amostras da região de Xinjiang

Gene	Suscetibilidade (%)		
	Baixa	Intermédia	Elevada
<i>tetM</i>	12		
<i>tetM</i> e <i>tetL</i>	70		
<i>tetL</i>	10		
<i>tetO</i>			
-----	8	100	100

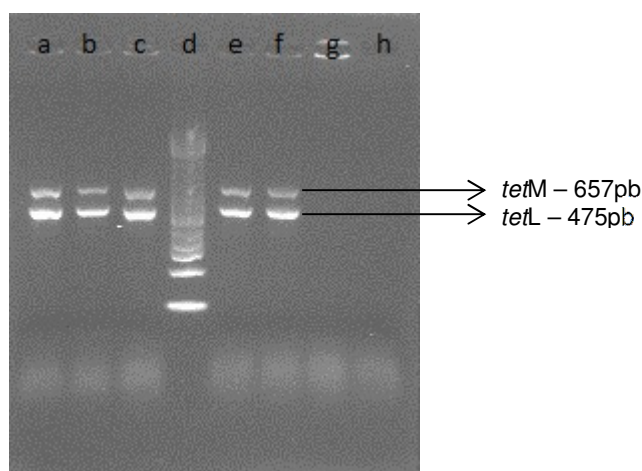


Figura 5 - Gel resultante do PCR de pesquisa de genes de resistência à tetraciclina. a – FCH5-2, b – FCH5-3, c- FCH19-5, d- marcador 100bp DNA *Ladder*, e – FCH19-7, f – FCH19-8, g – FCH19-11, h – branco.

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que a maioria dos isolados possui dois mecanismos de resistência, produzem genes para a produção de proteínas como parte de um mecanismo de proteção ribossomal (*tetM*) e genes que codificam para bombas de efluxo (*tetL*). Existem 22% dos isolados que apenas possuem um mecanismo de resistência, os restantes 8% dos isolados resistentes à tetraciclina não apresentam nenhum dos genes testados, podendo apresentar outro mecanismo de resistência como por exemplo a inativação química da tetraciclina codificada pelo gene *tetX*.

4.4.1.2 Isolados obtidos das amostras do Planalto Tibetano

Dos isolados resistentes à tetraciclina, 67% possuem o gene *tetM* e 33% possuem os genes *tetM* e *tetL*.

Os isolados com elevada ou intermédia suscetibilidade, não apresentaram nenhum dos genes testados. Tal como nos isolados obtidos das amostras de Xinjiang também nos isolados obtidos das amostras de *kiang* o gene *tetO* não foi detetado. Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados da pesquisa dos genes de resistência à tetraciclina para as amostras do Planalto Tibetano

Gene	Suscetibilidade (%)		
	Baixa	Intermédia	Elevada
<i>tetM</i>	67		
<i>tetM</i> e <i>tetL</i>	33		
<i>tetL</i>			
<i>tetO</i>			
-----		100	100

No caso das amostras do Planalto Tibetano, a maioria dos isolados apresentam genes de resistência para a produção de proteínas (67%) e os restantes possuem dois mecanismos, produção de proteínas e bombas de efluxo.

O gene que mais predomina nos isolados obtidos de ambas as regiões foi o *tetM*, este resultado vai de encontro aos resultados obtidos em bactérias entéricas dos pinguins da Antártida ^[25] onde este gene também foi detetado.

4.4.2 Caracterização da resistência aos macrólidos

4.4.2.1 Isolados obtidos das amostras de Xinjiang

Todos os isolados identificados como *Enterococcus* foram testados para a presença de *ermA*, *ermB* e *ermC*. Dos resistentes à eritromicina, 91,1% possuem o gene *ermB*, 8,9% é resistente mas não apresenta nenhum dos genes testados.

No que diz respeito aos isolados com elevada suscetibilidade, 25% apresenta o gene *ermB* e os restantes 75% não apresentou nenhum dos genes testados.

Relativamente aos isolados com suscetibilidade intermédia, 27,3% possuem o gene *ermB* e os restantes 72,7% não apresenta nenhum dos genes. Os genes *ermA* e *ermC* não foram detetados em nenhum dos isolados. Os resultados encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados da pesquisa de genes de resistência aos macrólidos para as amostras da região de Xinjiang

Gene	Suscetibilidade (%)		
	Baixa	Intermédia	Elevada
<i>ermA</i>			
<i>ermB</i>	91,1	27,3	25
<i>ermC</i>			
-----	8,9	72,7	75

Os resultados obtidos permitem afirmar que dos isolados testados apenas um mecanismo de resistência foi detetado, associado ao gene *ermB* (alteração do local alvo devido à produção de enzimas), que se verificou fundamentalmente em bactérias resistentes (91,1%), tendo sido também detetado em bactérias com suscetibilidade intermédia (27,3%) e elevada (25%). Alguns dos isolados não apresentaram nenhum dos genes testados podendo apresentar outros genes que não os testados ou outro mecanismo de resistência, como por exemplo, codificar genes para a produção de bombas de efluxo.

4.4.2.2 Isolados obtidos das amostras do Planalto Tibetano

Dos 30 isolados identificados como *Enterococcus*, dos que apresentaram diminuição da suscetibilidade em 33% foi detetado o gene *ermB* nos restantes 67% não foi detetado nenhum dos genes testados.

Relativamente aos isolados com elevada suscetibilidade estes não apresentaram nenhum dos genes.

No que diz respeito aos isolados com suscetibilidade intermédia, 12% apresentou o gene *ermB* e os restantes 88% não apresentaram nenhum dos genes testados. Assim como aconteceu com os isolados provenientes das amostras de Xinjiang também os isolados provenientes das amostras de *kiang* não foram detetados os genes *ermA* e *ermC* em nenhum dos isolados testados. Os resultados encontram-se na Tabela 14 e a Figura 6 representa um dos géis obtidos do PCR de pesquisa para genes de resistência à eritromicina.

Tabela 14 - Resultados da pesquisa de genes de resistência aos macrólidos para as amostras do Planalto Tibetano

Gene	Suscetibilidade (%)		
	Baixa	Intermédia	Elevada
<i>ermA</i>			
<i>ermB</i>	33	12	
<i>ermC</i>			
-----	67	88	100

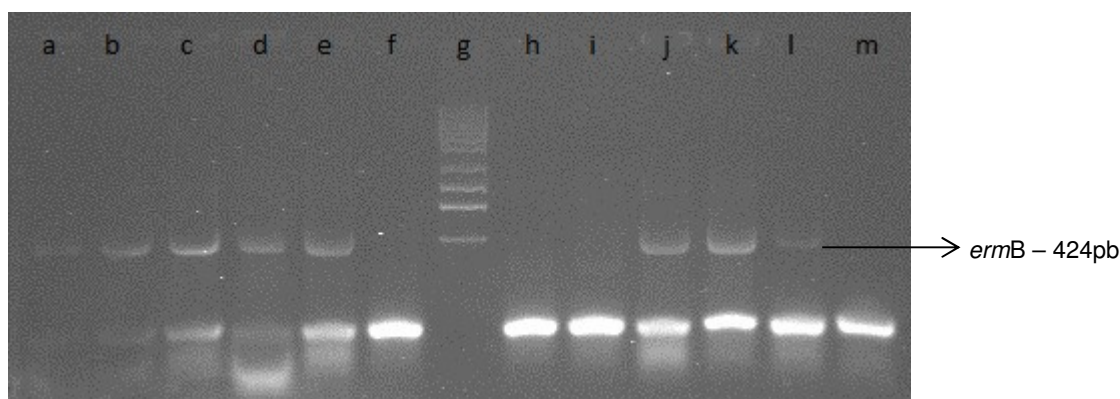


Figura 6 - Gel resultante do PCR de pesquisa de genes de resistência aos macrólidos. a – FCH20-11, b – FCH20-12, c – FCH25-9, d – FCH25-12, e – FCH2-13, f – FCH4-1, g – marcador 1kb DNA *Ladder*, h – FCH4-14, i – FCH4-15, j – FCH6-1, k – FCH6-4, l – FCH6-5, m – branco.

Ao contrário do que aconteceu com as amostras de Xinjiang a maioria dos isolados não apresenta nenhum dos genes testados, podendo apresentar outros genes ou mecanismos de resistência.

Para os *Enterococcus* em que foram pesquisados genes de resistência aos macrólidos, quer para isolados provenientes das amostras da região de Xinjiang quer

para os isolados provenientes das amostras de *kiang*, o gene que predominou foi o *ermB*. Este resultado vai de acordo com um estudo efetuado em animais e humanos na Dinamarca, onde o gene predominante nos *Enterococcus* também foi o *ermB*.^[46] Outros trabalhos também indicam que a resistência aos macrólidos é geralmente mediada por este gene.^[1] Estes resultados reforçam a ideia de que as estirpes resistentes não se encontram confinadas ao ambiente hospitalar.

4.4.3 Pesquisa de *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}

Para os isolados com diminuição da suscetibilidade à cefotaxima e à amoxicilina testou-se a presença dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} por PCR.

4.4.3.1 Isolados obtidos das amostras de Xinjiang

Dos isolados obtidos das amostras de Xinjiang, no que diz respeito aos que apresentaram resistência, em todos foi detetado o gene *bla*_{CTX-M}.

Relativamente aos que apresentaram suscetibilidade intermédia, em 70% dos isolados foi detetada a presença de *bla*_{CTX-M}.

No que diz respeito ao gene *bla*_{TEM}, este só foi detetado em 3 dos isolados testados. Já o gene *bla*_{SHV} não foi detetado em nenhum dos isolados testados.

Atualmente, vários surtos nosocomiais de organismos produtores de ESBL têm sido descritos por todo mundo. As β -lactamases do tipo CTX-M têm sido maioritariamente detetadas em *E. coli*, *K. pneumoniae* e mais recentemente em *A. baumannii*. Também nos isolados obtidos em que foi detetada a presença de *bla*_{CTX-M} a maioria foi identificada como *E. coli*, os restantes foram identificados como *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e ainda *E. sakazakii* e *B. cepacia*. Desta forma é possível concluir que nestes ambientes remotos também se encontram organismos com resistências idênticas às encontradas nos hospitais.^[35]

4.4.3.2 Isolados obtidos das amostras do Planalto Tibetano

Nesta segunda localização, não foram registados isolados com resistência à cefotaxima e à amoxicilina, sendo que apenas os que apresentaram suscetibilidade intermédia foram testados. Nestes isolados nenhum dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} foram detetados.

4.5 Pesquisa da presença de Integrrões

A presença de integrrões foi pesquisada para isolados que apresentaram resistência em relação aos aminoglicosídeos e aos β -lactâmicos.

4.5.1 Isolados obtidos das amostras de Xinjiang

Para os isolados provenientes das amostras de Xinjiang de todos os isolados que foram testados, 23 não apresentaram nenhum integrão. Na tabela seguinte (Tabela 15) apresentam-se os integrões que foram detetados, o seu tamanho e proveniência do isolado testado.

Tabela 15 - Integrões encontrados, o seu tamanho e proveniência do isolado

Isolado	Animal	Identificação	Fenótipo de resistência ^b	Integrões (pb)
FCH 2-7	Burro selvagem da Mongólia	<i>E. coli</i>	AMC; TOB; CIP; AML	300 e 1000-2750
FCH 3-7		N.I. (Gram negativo, não fermentador da lactose, oxidase positivo)	CAZ; TOB; ATM	400
FCH 4-2		<i>D. acidovorans</i>	TOB; CIP; GEN	1000
FCH 4-6		<i>R. radiobacter</i>	CAZ; TOB; ATM	400 e 1000-2750
FCH10-7	Lobo Tibetano	<i>E. coli</i>	AMC; TOB; CIP; AML	300 e 1000-2750
FCH 16-8	Cavalo Przewalski	N.I. (Gram negativo, não fermentador da lactose, oxidase negativo)	CIP; AML; GEN	500
FCH 19-3	Marmota cinzenta	<i>D. acidovorans</i>	TOB; CIP; GEN	1000
FCH 23-4		<i>P. mirabilis</i>	IPM; TOB; CIP; AML; GEN	2700
FCH 25-1	Camelo bactriano	<i>A. baumannii</i>	CTX; CAZ; AML	300-400
FCH 25-2		N.I. (Gram negativo, não fermentador da lactose, oxidase negativo)	CTX; CAZ; AML	300-400
FCH 25-7		<i>E. coli</i>	CIP; AML; GEN; TE	300 e 1000-2750
FCH 28-5		<i>A. baumannii</i>	CTX; CAZ; AML	300-400
FCH 28-7		<i>E. coli</i>	AMC; TOB; CIP; AML	300 e 1000-2750
FCH 29-11		<i>E. coli</i>	AMC; TOB; CIP; AML	1000-2750
FCH 30-5		<i>E. coli</i>	AMC; TOB; CIP; AML	1000-2750
FCH 32-2	Cabra selvagem	<i>A. baumannii</i>	AMC; CTX; CAZ; CIP; AML	300-400
FCH 32-3		N.I. (Gram negativo, fermentador da lactose)	AMC; CTX; CAZ; CIP; AML	300-400
FCH 32-5		N.I. (Gram negativo, fermentador da lactose)	AMC; CTX; AML	300-400

^b foram também considerados os isolados com suscetibilidade intermédia; N.I. – Não Identificado

Os genes de resistência a aminoglicosídeos e a β -lactâmicos encontram-se comumente localizados em integrões. Foram detetados integrões em isolados com fenótipos de resistência a esses dois grupos de antibióticos, podendo este tipo de elementos constituir uma plataforma genética importante que pode possivelmente albergar os genes que codificam para a resistência observada.

4.5.2 Isolados obtidos das amostras do Planalto Tibetano

No caso dos isolados provenientes das amostras do Planalto Tibetano, nos 9 isolados testados não foi detetado nenhum integrão.

5. Conclusão Geral

A emergência e evolução da resistência a agentes antimicrobianos constitui um dos fenómenos mais preocupantes de Saúde Pública da atualidade, tendo vindo, nos últimos anos, a representar um desafio constante à escala mundial.

É frequente a resistência a antibióticos em bactérias provenientes de ambientes hospitalares onde a aglomeração de pessoas e o constante uso de antibióticos durante o processo terapêutico contribuem para a rápida emergência de estirpes bacterianas com elevados níveis de resistência, resultantes de mecanismos de adaptação a um ambiente seletivo e hostil. No entanto, o contributo de outros ambientes e nichos ecológicos extra-hospitalares para a dinâmica da emergência e disseminação da resistência aos antibióticos, permanece desconhecido. Assim, o interesse pelo estudo de outros ambientes não-clínicos, como áreas remotas e muitas vezes exóticas do Globo, afastadas da elevada pressão antropogénica, tem vindo recentemente a emergir como uma abordagem importante para a deteção e/ou identificação de novos mecanismos de resistência.

Tendo em conta que as amostras em estudo provinham de animais endémicos de uma das regiões mais remotas do planeta, onde a influência humana na ecologia da resistência antimicrobiana será extremamente escassa e o efeito da pressão seletiva exercido pela utilização dos antibióticos será virtualmente nulo, a ausência de bactérias com resistência a agentes antimicrobianos seria teórica e naturalmente o resultado mais esperado. No entanto, e de uma forma simultaneamente surpreendente e promissora, os resultados obtidos neste estudo indicam a existência de bactérias, nas fezes de várias espécies de animais selvagens, com características de multirresistência, muito similares às geralmente encontradas em ambiente hospitalar.

A presente tese tinha como principal objetivo contribuir para a caracterização da flora microbiana associada a diferentes espécies animais selvagens da região de Xinjiang e do burro selvagem tibetano (*Equus kiang*) que habita o Planalto Tibetano. Assim como, verificar até que ponto o fenómeno da resistência aos agentes antimicrobianos, extravasando as fronteiras do ambiente hospitalar, se podia estar a disseminar para áreas mais remotas do globo.

Tendo em conta os resultados obtidos no presente trabalho e os objetivos que se pretendia alcançar foi possível retirar as conclusões que se referem a seguir.

- É frequente a resistência a antibióticos em bactérias provenientes de ambientes hospitalares onde a aglomeração de pessoas e o constante uso de

antibióticos durante o processo terapêutico contribuem para a rápida emergência de estirpes bacterianas com elevados níveis de resistência, resultantes de mecanismos de adaptação a um ambiente seletivo e hostil. Também em áreas remotas, pouco povoadas se verifica a existência de bactérias resistentes a antibióticos de uso habitual em processos terapêuticos.

- Em geral, foi possível isolar bactérias que apresentaram fenótipos de resistência a partir das amostras de todos os animais da região de Xinjiang.
- Foram isoladas bactérias com fenótipos de resistência ao imipenemo, como é o caso da *Brevundimonas vesicularis* e do *Proteus mirabilis*. Sendo este um antibiótico de uso hospitalar exclusivo a sua presença em animais que habitam ambientes tão remotos, com pressões humanas extremamente reduzidas, reveste-se de grande importância.
- Nos *Enterococcus* obtidos registou-se uma elevada resistência à tetraciclina e à vancomicina, também este último um antibiótico de uso hospitalar exclusivo.
- Na pesquisa os genes de resistência à tetraciclina não foi detetado o gene *tetO*, já o gene mais frequentemente encontrado foi o *tetM*.
- No que diz respeito à resistência aos macrólidos, apenas foi encontrado o gene *ermB*, gene que é geralmente responsável pela resistência a estes antibióticos.
- A presença de bactérias resistentes a antibióticos em que não foram detetados nenhum dos genes testados sugere que outros genes ou mecanismos de resistência além dos testados podem estar presentes.
- Em todos os isolados resistentes à cefotaxima foi detetado o gene *bla_{CTX-M}*. As mesmas espécies identificadas como sendo resistentes e apresentando o gene *bla_{CTX-M}* são algumas das que causam infeções nosocomiais nos hospitais.
- Em algumas das bactérias cujos fenótipos de resistência indicava a presença de genes comumente localizados em integrões esse tipo de plataforma genética foi de facto detetada.

6. Referências bibliográficas

1. Silva, C. 2005. Epidemiologia da resistência aos antibióticos em *Enterococcus* spp. portugueses de origem humana animal e ambiental. Tese de doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
2. Sjölund, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Bengtsson, S., Cederbrant, G., Pinhassi, J., Kahlmeter, G., Olsen, B. 2008. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the arctic. *Emerging Infectious Diseases*. **14**: 70-72.
3. Quinteira, S. 2005. Eco-epidemiologia de bacilos de Gram negativo produtores de carbapenemases com impacto clínico. Tese de doutoramento. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
4. Ledberg, J. 1997. Infectious diseases as an evolutionary paradigm. *Emerging Infectious Diseases*. **3**: 417-423.
5. Allen, H., Donato J., Wang, H., Cloud-Hansen, K., Davies, J., Handelsman, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*. **8**:251– 259.
6. Livermore, DM., Warner, M., Hall, LMC., Enne, VI., Projan, SJ., Dunman, PM., Wooster, SL., Harrison, G. 2001. Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west wales. *Environmental Microbiology*. **3**:658-661.
7. Martinez, J. 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of The Royal Society B*. **276**: 2521–2530.
8. Singer, R., Ward, M., Maldonado, G. 2006. Can landscape ecology untangle the complexity of antibiotic resistance? *Nature Reviews Microbiology*. **4**:943-952.
9. Thaller, M., Migliore, L., Marquez, C., Tapia, W., Ceden, V., Rossolini, G., Gentile, G. 2010. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of galapagos land iguanas: no man, no resistance. *PLoS ONE*. **5**: e8989.
10. Bartoloni, A., Pallecchi, L., Rodríguez, H., Fernandez, C., Mantella, A., Bartalesi, F., Strohmeyer, M., Kristiansson, C., Gotuzzo, E., Paradisi, F., Rossolini, GM. 2009. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **33**:125-129.
11. Pallecchi, L., Lucchetti, C., Bartoloni, A., Bartalesi, F., Mantella, A., Gamboa H., Carattoli, A., Paradisi, F., Roussolini, JM. 2007. Populations structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from remote community

- minimal antibiotic exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**:1179-1184.
12. D'Costa, VM., King, CE., Kalan, L., Morar, M., Sung, WL., Schwarz, C., Froese, D., Zetzler, G., Calmels, F., Debruyne R., Golding, GB., Poinar, HN., Wright, GD. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. **477**:457-460.
 13. Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, ED., Johnston, MD., Barton, H.A, Wright, GD. 2012. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE*. **7**: e34953.
 14. Gilliver, M., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S., Hart, C. 1999. Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature*. **401**:233-234.
 15. Osterblad, M., Norrdahl, K., Korpimäki, E., Huovinen, P. 2001. Antibiotic resistance. How wild are wild mammals? *Nature*. **409**:37-38.
 16. Anderson, J., Parrish, T., Akhtar, M., Zurek, L., Hirt, H. 2008. Antibiotic Resistance of Enterococci in American Bison (*Bison bison*) from a Nature Preserve Compared to That of Enterococci in Pastured Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**:1726-1730.
 17. Kovalevskaya, NP. 2002. Mobile gene cassettes and integrons. *Molecular Biology*. **36**:196-201.
 18. Fluit, AC., Schmitz, FJ. 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **18**:761-770.
 19. Bennett, PM. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **43**:1-4.
 20. Sousa, JC. 2005. Manual de antibióticos antibacterianos. Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
 21. Nogueira, A. 2010. Pesquisa de genes que conferem resistência a inibidores da síntese proteica em *Enterococcus* sp. oriundos do ambiente de suiniculturas. Monografia. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa.
 22. Giedaitiene, A., Vitkauskienė, A., Naginiene, R., Pavilonis, A. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*. **47**:137-146.
 23. Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., Wondrack L. 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **40**:2562-2566.

24. Drobni, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Haemig, P., Olsen, B. 2009. Vancomycin-resistant enterococci, point barrow, alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases*. **15**:838-839.
25. Rahman, MH., Sakamoto, KQ., Nonaka, L., Suzuki. 2008. Occurrence and diversity of the tetracycline resistance gene *tet* (M) in enteric bacteria of Antarctic Adélie penguins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **62**:627-628.
26. Radhouandi, H., Igrejas, G., Carvalho, C., Pinto, L., Gonçalves, A., Lopez, M., Sargo, R., Cardoso, L., Martinho, A., Rego, V., Rodrigues, R., Torres, C, Poeta, P. 2001. Clonal linages, antibiotic resistance and virulence factors in vancomycin, resistant Enterococci isolated from fecal samples of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Journal of Wildlife Diseases*. **43**:769-773.
27. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. (www.iucnredlist.org).
28. ISO 6579 de 15 de julho 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
29. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2007. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement* M100-S17. CLSI, Wayne, PA, USA.
30. Jarlier, V., Nicolas, MH., Fournier, G., Philippon, A. 1998. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infectious Diseases*. **10**: 867-878.
31. Danbing, K., Picard, F., Martineau, F., Ménard, C., Roy, P., Oullette, M., Bergeron, M. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**:3497-3503.
32. Dukta-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**:24-27.
33. Soltani, M., Beighton, D., Philpott-Howard, J., Woodford, N. 2012. Mechanisms of resistance to quinupristine-dalfopristine among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**:433-436.
34. Aarestrup, FM., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, JB. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. **37**:127-137.

35. Amaral, SN., Peixe, LV., Machado, E. 2009. Characterization of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) among *Enterobacteriaceae* from a portuguese hospital. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. **6**:254-263.
36. Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, JC., Rollán, A., Peixe, L., Coque TM. 2005. Integron content of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1823–1829.
37. Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, PH. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39**:185-191.
38. Zhang, C., Hsu, H., Li, C. 2012. *Brevundimonas vesicularis* bacteremia resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime in a tertiary hospital of southern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. **45**:448-452.
39. Sheng, Z., Li, J., Sheng, G., Sheng, J., Li, L. 2010. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Proteus mirabilis* in Hangzhou, China. *China Medicine Journal*. **123**:2568-2570.
40. Galani, I., Souli, M., Koratzanis, E., Koratzanis, G., Chrysosouli, Z., Guimarellou, H. 2007. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1 in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **59**:578-579.
41. Chotikanatis, K., Backer, M., Rosas-Garcia, G., Hammerschlag, MR. 2011. Recurrent intravascular-catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* in a hemodialysis patient. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**: 3418-3421.
42. Novais, C., Sousa, J., Coque, T., Peixe, L., The portuguese resistance study group. 2005. Molecular characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates from portuguese hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**:3073-3079.
43. Novais, C., Coque, T., Ferreira, H., Sousa, J., Peixe, L. 2005. Environmental contamination with vancomycin-resistant Enterococci from hospital sewage in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **71**:3364-3368.
44. Novais, C., Coque, T., Boerlin, P., Herrero, I., Moreno, M., Dominguez, L., Peixe, L. 2005. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clone in swine, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. **11**:1985-1987.

45. Sgrelli, A., Mencacci, A., Friori, M., Orlandi, C., Baldelli, F., Vittorio, G., Socio, L. 2012. *Achromobacter denitrificans* renal abscess. *New Microbiologica*. **35**: 245-247.
46. Jensen, L., Moller, N., Aarestrup, F. 1999. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*. **170**:151-158.